

⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 798 146

⑫ N° d'enregistrement national : 99 15022

⑮ Int Cl⁷ : C 25 B 3/10, C 08 G 73/06, G 01 N 33/543, 27/327,
27/414, C 12 Q 1/68, C 07 D 207/325

⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑲ Date de dépôt : 29.11.99.

⑳ Priorité : 12.08.99 FR 09910535.

⑴ Demandeur(s) : UNIVERSITE JOSEPH FOURIER —
FR.

⑵ Inventeur(s) : COSNIER SERGE.

⑶ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 09.03.01 Bulletin 01/10.

⑷ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑸ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑶ Titulaire(s) :

⑷ Mandataire(s) : BEAU DE LOMENIE.

⑸ ELECTROPOLYMERES PHOTOGREFFABLES, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS
COMME SUPPORTS DE SONDES DE RECONNAISSANCE SPECIFIQUE DANS DES BIOCAPTEURS
ELECTRONIQUES.

⑹ L'invention concerne de nouveaux électropolymères
photogreffables économiques, sur lesquels peuvent être
aisément greffées des sondes de reconnaissance spécifi-
ques ayant une capacité optimale de réaction avec des ana-
lytes cibles (ADN/ ADN_c, APN/ APN_c, enzyme/ substrat,
Anticorps/ Antigène).

Ces électropolymères photogreffables sont e. g. des
poly (pyrrole-benzophénone). La benzophénone forme des
sites de photogreffage.

L'invention vise également les mono et oligomères
constitutifs de ces nouveaux électropolymères photogreffa-
bles.

Leur procédé de fabrication est un autre objet de l'inven-
tion de même que les biocapteurs électroniques compren-
ant ces électropolymères photogreffables et/ ou
photogreffables par des sondes pour l'analyse de biomolé-
cules.

BEST AVAILABLE COPY

FR 2 798 146 - A1



plan peut être utilisée pour identifier et quantifier des ADN ou ARN fonctionnalisés par des marqueurs fluorescents.

Toutefois, un verrou technologique demeure dans l'élaboration des microbiocapteurs. En effet, l'immobilisation stable, reproductible et spatialement
5 contrôlée de sondes de reconnaissance spécifique (par exemple d'oligonucléotides, de polyacide nucléiques peptidiques ou de protéines) avec rétention totale de leurs propriétés biologiques reste un problème crucial. Effectivement, la plupart des procédures conventionnelles d'immobilisation de sondes e.g. protéiques, comme la réticulation, le greffage covalent ou le piégeage dans des gels ou des membranes
10 souffre d'une faible reproductibilité et d'une mauvaise résolution spatiale.

D'autres approches d'immobilisation de sondes par exemple protéiques, ont été développées à partir de technologies conventionnelles d'impression comme le "screen printing" et le "ink-jet deposition" permettant une localisation précise de la protéine. Toutefois, l'immobilisation par piégeage de la protéine peut réduire
15 l'accessibilité de cette dernière et donc diminuer l'efficacité des interactions spécifiques du type oligonucléotides complémentaires, anticorps-antigène ou enzyme-substrat.

Plus récemment, une autre méthode a mis en jeu le dépôt contrôlé de microvolumes (5nl) contenant la protéine à des emplacements précis. Dans cette approche, les problèmes rencontrés sont des problèmes d'évaporation nécessitant de
20 travailler dans des pièces à humidité contrôlée et des problèmes de contamination d'un dépôt à un autre.

Il est également connu de recourir à la photolithographie de groupes photoactivables pour immobiliser des biomolécules sur des supports compris dans des microtransducteurs de biocapteurs.

25 C'est ainsi que l'article de L.F. Rozsnyai, D.R. Benson, S.P.A. Fodor et P.G. Schultz, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31 (1992) 759, décrit l'ancrage covalent d'anticorps sur un support en silice fonctionnalisé par des motifs photoactivables du type benzophénone. La fonctionnalisation (ou dérivatisation) des substrats en silice est réalisée à l'aide de 3-aminopropyltriéthoxysilane protégé par des groupements
30 t-butyloxycarbonyl(Boc). Après déprotection du silane de surface, un ester N-hydroxysuccinimide de l'acide 3-benzoylbenzoïque est couplé au silane de surface. On dépose ensuite les anticorps à greffer sur le support et on expose ces derniers, au travers d'un masque, à un rayonnement lumineux qui activera dans les zones découvertes la liaison de l'immunoglobuline aux carbonyles des motifs benzophénones
35 fixés sur le support.

La demande de brevet internationale PCT WO 92/10092 décrit une technique de synthèse in situ d'un réseau d'oligonucléotides sur un substrat silicium

de protéines ou d'oligonucléotides ne s'avère pas la méthode la plus appropriée pour la fabrication de biocapteurs.

5 Une approche légèrement différente consiste à électrogénérer un polymère comportant des groupements susceptibles de générer un couplage covalent avec une protéine. Ainsi des enzymes et des oligonucléotides ont pu être immobilisés sur des polypyrroles par greffage chimique. Toutefois, ces réactions chimiques peuvent dénaturer les substances sondes sensibles (protéines-polynucléotides).

10 Une stratégie plus prometteuse de fixation de sondes, par exemple protéiques ou oligonucléotidiques, sur des films électrogénérés, est l'immobilisation par l'intermédiaire de systèmes affins, qui préservent totalement l'activité biologique des protéines. Selon cette stratégie, on procède à l'électrogénération d'un film polymère fonctionnalisé par des motifs biotine. En raison des fortes interactions affines entre la biotine (poids moléculaire = 250 D) et l'avidine (poids moléculaire = 66 000 D) une monocouche d'avidine peut se former spontanément à la surface du polymère, par simple immersion du support, en l'occurrence du transducteur, dans une solution aqueuse d'avidine. La fixation ultérieure de sondes biotinylées (enzyme, anticorps, antigène, oligonucléotides, polyacide nucléique peptidique..) intervient également par simple immersion du support, en l'occurrence du transducteur, modifié par l'avidine, dans la solution aqueuse de substance sonde choisie, la constante d'association entre l'avidine et les motifs biotine étant : $K_a = 10^{15} \text{M}^{-1}$. L'immobilisation de sondes, par exemples protéiques, est ainsi réalisée par un ancrage non dénaturant conférant une accessibilité maximale à la protéine.

20 L'inconvénient majeur de cette méthode électroaffine est la nécessité d'utiliser des sondes, en particulier des protéines marquées par des fonctions biotine ou des sondes, en particulier des protéines, conjuguées à des avidines.

25 A titre d'illustration de ces techniques électroaffines, on renverra aux articles suivants:

- "Electrogeneration of biotinylated functionalized polypyrroles for the simple immobilization of enzymes" S. Cosnier, B. Galland, C. Gondran et A. Le Pellec, 30 Electroanalysis, 10 (1998) 808.
- "Poly(pyrrole-biotine) : a new polymer for biomolecule grafting on electrode surfaces", S. Cosnier et A. Le Pellec, Electrochim. Act, 44 (1999) 1833.

35 On connaît également des électropolymères sur lesquels sont greffés chimiquement des substances sondes sensibles. Ces électropolymères porteurs de sondes greffées chimiquement ont vocation à être utilisés comme moyens d'immobilisation de sondes ou de marqueurs dans des biocapteurs.

- de faire intervenir un mode d'immobilisation des sondes sensibles qui ne porte pas préjudice à leur capacité d'interagir spécifiquement avec les molécules cibles à analyser,
- d'être porteuse de sondes sensibles (par exemple protéines, oligonucléotides, polyacides nucléique peptidique.....) qui ne soient pas dénaturées lors de l'immobilisation,
- d'offrir la possibilité de contrôler aisément la localisation des sondes de façon à pouvoir réaliser des réseaux de sondes.
- de pouvoir être obtenue de manière simple et économique de façon à pouvoir être industrialisable.

L'un des objectifs essentiels de la présente invention est de pallier ces carences en fournissant de nouveaux polymères sur lesquels peuvent être greffés aisément des sondes de reconnaissance spécifique, non dénaturées, ayant une capacité optimale de réaction avec les analytes cibles et dont la localisation soit contrôlable, ces nouveaux polymères se devant également d'être d'un coût de revient modéré.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir de nouveaux moyens d'immobilisation de sondes spécifiques du type peptide polynucléotide, polyacide nucléique peptidique....., permettant une immobilisation stable, économique, non dénaturante et spatialement contrôlée des sondes.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des procédés de préparation des électropolymères susvisés qui sont susceptibles de constituer un support d'immobilisation adapté pour sondes de reconnaissance spécifique pour (micro)biocapteurs électroniques.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir de nouveaux monomères à partir desquels les polymères susvisés sont susceptibles d'être obtenus.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de fabrication de biocapteur faisant intervenir la préparation des électropolymères sus-évoqués.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un biocapteur électronique dont la membrane sensible est constituée par les polymères susvisés sur lesquels sont greffés des sondes de reconnaissance spécifique.

Ces objectifs, parmi d'autres, sont atteints par la présente invention qui concerne en premier lieu de nouveaux polymères obtenus par électropolymérisation et caractérisés en ce qu'ils comprennent des motifs photoactivables.

Les électropolymères selon l'invention peuvent être préparés rapidement et aisément sous forme de films, en contrôlant de manière précise l'épaisseur du film par l'intermédiaire de la charge électrique mise en œuvre. Ces électropolymères

Les électropolymères ne peuvent se former que sur des surfaces conductrices ou des semi-conducteurs capables de véhiculer la charge électrique nécessaire à la polymérisation. Cette caractéristique permet d'envisager un adressage électrochimique. Cela signifie qu'en alimentant en courant électrique certaines zones du support conducteur, de préférence à d'autres, on peut circonscrire la formation du polymère dans ces zones alimentées et obtenir ainsi des zones différenciées et indépendantes porteuses chacune d'une sonde photogreffée donnée.

Les électropolymères photogreffables selon l'invention sont propres à se lier de manière simple, économique, reproductible et spatialement contrôlée à des sondes de reconnaissance spécifique, qui peuvent être des protéines, des polynucléotides, des polyacides nucléiques peptidiques ou analogues.

Une telle immobilisation par photogreffage permet de s'affranchir du recours à des réactifs chimiques éventuellement dénaturants. De plus, la technique est simple car les sondes n'ont pas besoin d'être prétraitées ou fonctionnalisées pour pouvoir être greffées. Enfin, le greffage peut s'opérer de manière précise et rapide, à l'aide de photomasques.

A propos des motifs photoactivables des électropolymères selon l'invention, il convient de signaler que lesdits motifs sont, de préférence, sélectionnés dans le groupe comprenant : les diazoniums, les phénylazides, les azobenzènes, les dérivés de benzophénone et les associations de ces motifs.

Conformément à l'invention, la benzophénone est un motif photoactivable particulièrement préféré.

De manière plus générale, on entend au sens de l'invention par motif photoactivable : un groupement chimique qui, sous irradiation, est converti en un composé hautement réactif susceptible de former une liaison covalente avec d'autres composés en solution en milieu soit organique soit aqueux.

Le taux de motifs photoactivables des électropolymères selon l'invention est un paramètre qui permet de les caractériser.

Ainsi, il est particulièrement avantageux que, selon l'invention, au moins 0,01 % en nombre de ses (co)monomères constitutifs, de préférence au moins 10 % en nombre de ses (co)monomères constitutifs, et plus préférentiellement encore chacun de ses comonomères constitutifs, est (sont) porteur(s) d'au moins un motif photoactivable.

Naturellement, les électropolymères selon l'invention peuvent être soit des homopolymères soit des copolymères.

Ces copolymères peuvent être de type bloc ou de type statistique.

Selon une caractéristique avantageuse de l'invention, les électropolymères photogreffables qu'elle concerne ont un degré de polymérisation DP_n compris entre

- à électropolymériser les (co)monomères, cette électropolymérisation étant de préférence réalisée sur un support conducteur en soumettant les (co)monomères à un balayage potentiel et/ou à une électrolyse à potentiel imposé (chronoampérométrie) ou à courant constant (chronopotentiométrie).

Selon que l'on souhaite obtenir des homo ou des copolymères, on utilisera des monomères identiques entre eux ou des comonomères appartenant au moins à deux espèces différentes.

Dans un mode particulièrement préféré de préparation l'électropolymérisation des monomères ou des comonomères fonctionnalisés ou non par au moins un motif photoactivable, est effectuée sur un support conducteur de manière à former un film d'électropolymère sur toute la zone soumise au champ électrique.

Il est parfaitement envisageable, pour un support d'électropolymérisation donné, de n'alimenter en courant électrique que certaines zones sélectionnées du support conducteur. On réalise ainsi un adressage électrochimique qui permet de localiser l'électropolymère photogreffable à des endroits bien précis.

Avantageusement, les (co)monomères copolymérisables mis en œuvre sont choisis :

- ☐ dans le sous-groupe des (co)monomères conducteurs comprenant :

-l'acétylène, les pyrroles, les thiophènes, les indoles, les anilines, les azines, les p-phénylènevinylènes, les p-phénylènes, les pyrènes, les furanes, les sélénophènes, les pyridazines, les carbazoles et leurs mélanges,

- ☐ et/ou dans le sous groupe des (co)monomères isolants comprenant les phénols, les ortho-phénylènediamine, les dichlorophénolindophénol et leurs mélanges.

Avantageusement, les motifs photoactivables sont sélectionnés dans le groupe comprenant les diazoniums, les phénylazides, les azobenzènes, les dérivés de benzophénone et les associations de ces motifs.

Sur le plan de la méthodologie, plusieurs procédures son envisageables conformément à l'invention. Ainsi, l'étape de greffage intervient avant ou pendant et ou après l'étape d'électropolymérisation.

Dans le mode préféré de mise en œuvre du procédé, on effectue la substitution des motifs photoactivables sur tous les monomères de départ avant d'engager l'électropolymérisation. Cette dernière implique donc des (co)monomères conjugués chacun à au moins un motif, de préférence un motif photoactivable.

- l'acétylène, les pyrroles, les thiophènes, les indoles, les anilines, les azines, les p-phénylènevinylènes, les p-phénylènes, les pyrènes, les furanes, les sélénophènes, les pyridazines, les carbazoles et leurs mélanges,

5 • et/ou dans le sous groupe des (co)monomères isolants comprenant les phénols, les ortho-phénylènediamine, les dichlorophénolindophénol et leurs mélanges.

Avantageusement, le motif photoactivable appartient au groupe comprenant : les diazoniums, les phénylazides, les azobenzènes, les dérivés de benzophénone et les associations de ces motifs.

10 La présente invention vise également à titre de produit industriel nouveau des oligomères susceptibles d'être utilisés, notamment dans le procédé tel que décrit ci-dessus, et caractérisés en ce qu'ils comportent un ou plusieurs monomères tels que décrit dans le paragraphe précédent.

15 Les électropolymères, (co)monomères et les oligomères présentés supra et ayant la propriété d'être photogreffables constituent d'autres objets nouveaux et inventifs lorsqu'ils portent des éléments photogreffés par l'intermédiaire de leurs motifs photoactivables. D'où il s'ensuit que l'invention concerne des polymères monomères et oligomères caractérisés en ce qu'ils comprennent des substituants photogreffés obtenus par réaction d'une ou plusieurs substances avec leurs motifs
20 photoactivables, ces substances étant de préférence choisies parmi les (macro)molécules biologiques et/ou les chimères de celles-ci et/ou parmi les unités de ces (macro)molécules et/ou de ces chimères.

A titre d'exemple de substances photogreffées on peut citer les acides aminés, les oligo peptides, les poly-peptides, les protéines, les gluco-protéines, les lipoprotéines
25 ou bien encore les nucléotides et oligonucléotides, les polynucléotides type ARN ou ADN, d'origine biologique ou synthétique, des enzymes, des coenzymes et des vitamines.

Comme exemples de chimères de biomolécules on peut citer les (poly)Acides Nucléiques Peptidiques, des sites prosthétiques d'enzymes tels que des
30 métalloporphyrines, des isobactérochlorines, des corrines, des chlorins, des anticorps artificiels à base par exemple de polymère à empreinte.

Selon encore un autre de ses aspects, la présente invention concerne un procédé de fabrication de biocapteurs électroniques du type de ceux comprenant au moins un (micro)transducteur comportant au moins une membrane sensible porteuse
35 de sondes de reconnaissance spécifiques de molécules cibles à analyser, caractérisé en ce que l'on réalise la membrane sensible fixée sur le support transducteur à partir d'au moins un polymère tel que décrit supra et en ce que l'on greffe (de préférence de

adressage électrochimique et par sa simplicité de greffage des molécules par photoactivation et photomasquage.

A titre d'autres exemples de biocapteurs on peut citer les immunocapteurs à lecture optique ou électrique mais également les microbalances à quartz.

- 5 La présente invention sera mieux comprise à la lumière des exemples qui suivent et qui décrivent l'obtention d'électropolymères photogreffables, leur caractérisation, le greffage de protéines sur ces électropolymères et la caractérisation des produits greffés obtenus. Ces exemples permettent également de faire ressortir tous les avantages et les variantes de l'invention.

10

EXEMPLES

Description des figures

La Fig. 1 est une courbe donnant la caractérisation électrochimique du monomère obtenu à l'exemple 1.1 à savoir le pyrrole-benzophénone.

- 15 La Fig. 2 est un voltamogramme illustrant l'électropolymérisation du monomère de l'exemple 1.1 pyrrole-benzophénone.

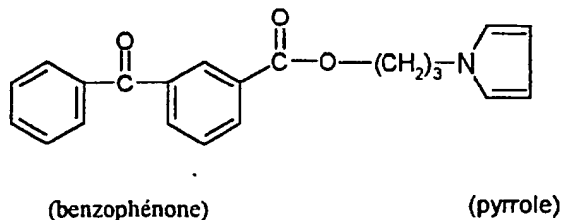
La Fig. 3 est une courbe de voltamétrie cyclique obtenue sur l'électrode revêtue de l'électropolymère photogreffable poly(pyrrole-benzophénone) obtenu à l'exemple 2.

- 20 La Fig. 4 montre 2 courbes représentant la variation de la fréquence F (Hz) en fonction du temps t (Δ), cette variation résultant de l'immobilisation d'avidine (exemple 3.2) sur des quartz de microbalance modifiés par des films de poly(pyrrole-benzophénone) et préalablement mis en contact avec une solution aqueuse de biotine avec irradiation (—) et sans irradiation (----).

25

EXEMPLE 1 - PREPARATION DES MONOMERES CONJUGUES AUX MOTIFS PHOTOACTIVABLES

1.1 - Monomère pyrrole benzophénone



30

irréversible à environ - 200 mV (Fig. 1). Ce pic correspond à la réduction, à la surface de l'électrode de platine, des protons libérés lors du phénomène de polymérisation des pyrrole-benzophénone. Après couplage de deux radicaux pyrroliques et perte de deux protons conduisant à la réaromatisation du dimère, ce dernier peut réagir de manière équivalente avec un radical cation du pyrrole-benzophénone. Par propagation électrochimique continue, une chaîne polypyrrolique est ainsi générée conduisant à un polymère insoluble. En milieu aprotique, le radical anion de la benzophénone étant stable, la benzophénone peut se réduire réversiblement à 1 électron. Effectivement, dans le domaine cathodique, un signal réversible à - 1,96 V (Fig. 1) correspondant à la réduction monoélectronique du pyrrole-benzophénone est observé.

EXEMPLE 2 - ELECTROPOLYMERISATION

2.1 -Obtention poly(pyrrole benzophénone)

Des balayages répétitifs de potentiel entre 0 et 0,86 V entraînent la formation d'un film pyrrolique à la surface de l'électrode. Cette formation est illustrée par l'apparition et la croissance d'un système rédox à + 0,32 V caractéristique de l'électroactivité des chaînes polypyrroliques (cf Fig. 2 Electropolymérisation du pyrrole benzophénone 3,6 mM dans CH₃CN + 0,1 M TBAP).

Après transfert de l'électrode dans une solution d'électrolyte exempte de monomère, le voltamogramme de cette électrode présente l'électroactivité classique des films polypyrroliques dans le domaine anodique. De plus, le signal réversible de la réduction des motifs benzophénone à $E_{1/2} = - 1,96$ V confirme la présence d'un film polymère à la surface de l'électrode (cf. Fig. 3 : Voltamétrie cyclique de l'électrode après polymérisation) ainsi que la présence des motifs photoactivables dans ce polymère.

EXEMPLE 3 - PHOTOGREFFAGE DE BIOMOLECULES SUR LES ELECTROPOLYMERES PHOTOGREFFABLES DE L'EXEMPLE 2

3.1 - Poly(pyrrole benzophénone) - ASB

L'irradiation d'un film de poly (p-pyrrole benzophénone) entraîne, en voltamétrie cyclique, une forte diminution (-54%) de l'intensité du système rédox à -2 V relatif à la fonction benzophénone. ce phénomène illustre la disparition de la fonction cétone et donc la réactivité de ce groupement sous irradiation.

Les macromolécules biologiques étant solubles quasi exclusivement en milieu aqueux, l'efficacité du greffage par irradiation a été testée en milieu aqueux.

3.3 - Poly (pyrrole benzophénone) - biotine

L'efficacité du photogreffage et l'accessibilité de la biomolécule immobilisée à la surface du polymère ont été examinées par des mesures gravimétriques avec le système affin avidine-biotine.

Des électrodes d'or recouvrant des quartz de microbalance ont été modifiées par un film de poly (pyrrole benzophénone). Deux quartz modifiés ont été mis en contact avec une solution aqueuse de biotine, l'un étant irradié et l'autre pas. En raison des fortes interactions affines entre la biotine (une vitamine, PM 250) et l'avidine (une protéine, PM 66000), l'association avidine-biotine s'effectue spontanément. Les mesures gravimétriques, en présence d'une solution d'avidine (0,5 mg/ml), indiquent une diminution de fréquence de 200 Hz et 70 Hz pour respectivement le polymère irradié et le polymère non irradié (voir Figure 4). Ceci correspond à un accroissement de masse à la surface du polymère de 358 ng cm⁻² dans le cas de l'irradiation et de 125 ng cm⁻² en absence d'irradiation.

Or l'immobilisation d'une monocouche compacte d'avidine correspond théoriquement à un accroissement de masse de 362 ng cm⁻². Il apparaît donc que l'irradiation induit le greffage efficace de biotine à la surface du polymère entraînant un recouvrement total de ce dernier par une monocouche d'avidine. En l'absence d'irradiation et donc de photogreffage de biotine, uniquement 34 % de la surface du polymère est recouverte d'avidine.

Ces résultats démontrent également que la biotine greffée conserve ses propriétés de reconnaissance vis à vis de l'avidine et conserve donc une excellente accessibilité.

- l'acétylène, les pyrroles, les thiophènes, les indoles, les anilines, les azines, les p-phénylènevinylènes, les p-phénylènes, les pyrènes, les furanes, les sélénophènes, les pyridazines, les carbazoles et leurs mélanges,

5 □ et/ou dans le sous groupe des (co)monomères isolants comprenant les phénols, les ortho-phénylènediamine, les dichlorophénolindophénol et leurs mélanges,

10 □ et en ce que les motifs photoactivables sont sélectionnés dans le groupe comprenant : les diazoniums, les phénylazides, les azobenzènes, les dérivés de benzophénone et les associations de ces motifs.

7 - Procédé selon la revendication 5 ou la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape de greffage intervient avant et/ou pendant et/ou après l'étape d'électropolymérisation.

15 8 - Monomère susceptible d'être utilisé notamment dans la préparation des polymères selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou dans le procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une entité électropolymérisable et au moins un motif photoactivable, en particulier tel que défini respectivement à la revendication 2 et/ou à la revendication 3, ce
20 monomère étant de préférence le monomère pyrrole benzophénone.

9 - Oligomère, susceptible d'être utilisé notamment dans la préparation des polymères selon l'une des revendications 1 à 4, ou dans le procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte plusieurs monomères selon la revendication 8.

25 10 - Polymères selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, monomères selon la revendication 8, ou oligomères selon la revendication 9, caractérisés en ce qu'ils comprennent des substituants photogreffés obtenus par réaction d'une ou plusieurs substances avec leurs motifs photoactivables, ces substances étant, de préférence, choisies parmi les (macro)molécules biologiques
30 et/ou les chimères de celles-ci et/ou parmi les unités de ces (macro)molécules et/ou de ces chimères.

11 - Procédé de fabrication de biocapteurs électroniques du type de ceux comprenant au moins un (micro)transducteur comportant au moins une membrane sensible porteuse de sondes de reconnaissance spécifique de molécules cibles à
35 analyser, caractérisé en ce que l'on réalise la membrane sensible fixée sur le support transducteur à partir d'au moins un polymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, et en ce que l'on greffe (de préférence de manière localisée), les

1/2

FIG.1

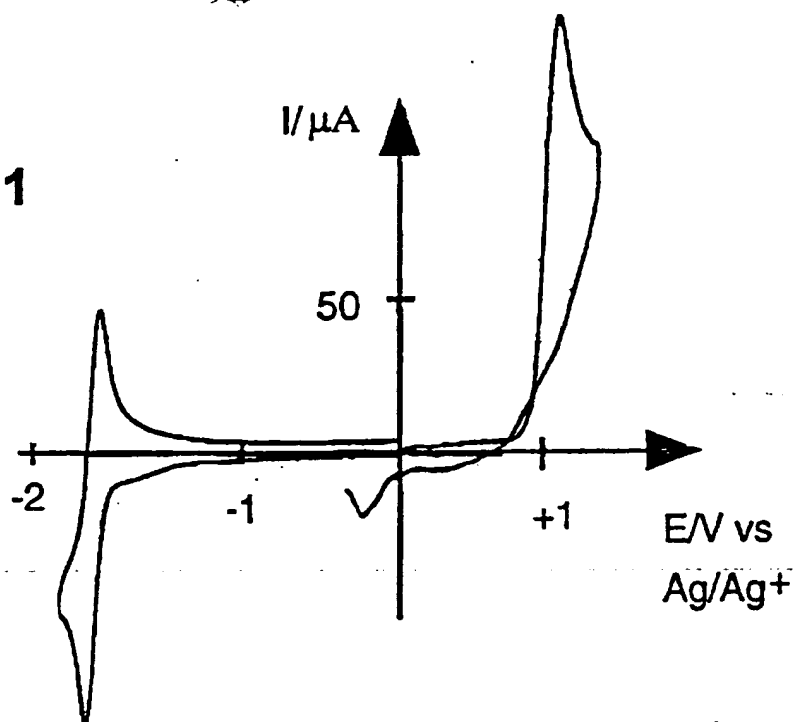
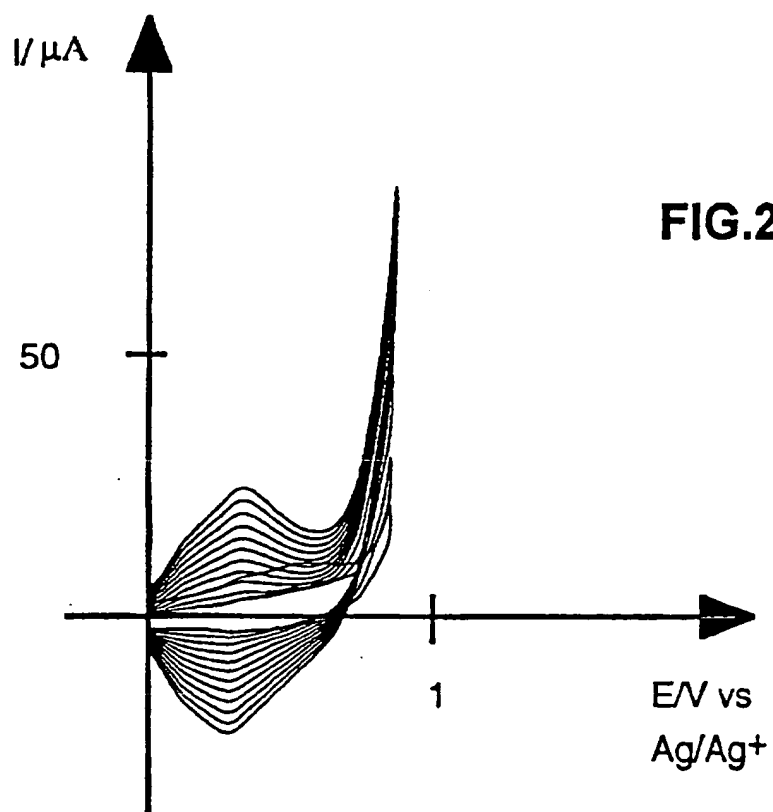


FIG.2



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199047 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A26, AN 1990-352848 XP002139597 & JP 02 255716 A (RICOH KK), 16 octobre 1990 (1990-10-16) * abrégé *	1-3
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199520 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A26, AN 1995-151827 XP002139598 & JP 07 076572 A (OSAKA GAS CO LTD), 20 mars 1995 (1995-03-20) * abrégé *	
D,A	WO 90 10655 A (ALLAGE ASSOCIATES INC) 20 septembre 1990 (1990-09-20) * revendications 1,2,13,14 *	1
D,A	WO 95 29199 A (BIO MERIEUX ;GARNIER FRANCIS (FR)) 2 novembre 1995 (1995-11-02) * revendications 1,2 *	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
		C08G H01B C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
6 juin 2000		Niaounakis, M
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
T : théorie ou principe à la base de l'invention		
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.		
D : cité dans la demande		
L : cité pour d'autres raisons		
& : membre de la même famille, document correspondant		
X : particulièrement pertinent à lui seul		
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général		
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.